

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УТВЕРЖДАЮ

 Декан ФИТ ТГУ
С.В. Шидловский

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**«СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА
АНТИБИОТИКОВ»**

Методические указания

Томск
2021

УДК 535.372

РАССМОТРЕНО И УТВЕРЖДЕНО учебно-методической комиссией факультета инновационных технологий, протокол № 18 от «28» октября 2021 г.

Председатель УМК ФИТ к.х.н. О.В. Вусович

Изложены рекомендации для выполнения лабораторной работы по исследованию спектров поглощения и флуоресценции антибиотиков в растворе. Методические указания разработаны в соответствии с тематикой лабораторных занятий и программой курсов: «Фотоника и лазерные технологии», «Физико-химические методы анализа» и «Физические поля и их действие на биосистемы» для студентов физического факультета и факультета инновационных технологий направления подготовки 03.04.02 «Физика» по основным образовательным программам «Фундаментальная и прикладная физика», «Биофотоника» и 27.03.05 «Инноватика».

Подготовлено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-32-90116). Лабораторная работа проводится на базе лаборатории фотофизики и фотохимии молекул и кафедры управления инновациями Томского государственного университета

Для преподавателей, аспирантов, студентов и слушателей ФПК.

СОСТАВИТЕЛИ: *О. Н. Чайковская, В.С. Чайдонова*

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Теоретическая часть.....	7
Рабочая установка.....	18
Практическая часть.....	27
Контрольные вопросы.....	28
Литература.....	28

ВВЕДЕНИЕ

Повсеместное использование антибиотиков привело к ряду проблем, которые при своем негативном воздействии на организм человека стали объектом внимания надзорных органов. Поэтому исследование их свойств, а особенно, диагностика остаточного их количества в организме человека и пищевых продуктах, сохраняют свою актуальность как на национальном, так и на международном уровне. Антибиотики используют для лечения инфекционных заболеваний людей и животных, для стимуляции роста животных, а также в пищевой промышленности для продления срока годности продуктов питания.

Современные требования к качеству лекарственных средств характеризуются тенденцией к получению новых или дополнительных данных о свойствах и химических превращениях лекарственных веществ в составе лекарственных форм с помощью таких методов, которые еще не получили широкого распространения в фармацевтическом анализе и контроле процесса производства.

Одной из фундаментальных проблем современной фотоники многоатомных органических соединений является установление зависимости спектрально-люминесцентных и фотохимических свойств многоатомных молекул от их электронного строения, природы электронно-возбужденных состояний и межмолекулярных взаимодействий. Решение ее в настоящее время имеет актуальность для таких смежных областей науки как биофизика, биохимия, синтез лекарственных препаратов и экология. Фотовозбуждение молекул приводит к существенному изменению их электронной структуры и реакционной способности [1, 2]. В случае фотохимических реакций растворитель может сильно

влиять на скорость и направление реакции. Это связано с тем, что возможность образования слабых комплексов с растворителем может менять взаимное расположение электронно-возбужденных состояний растворенной молекулы. Это проявляется, в первую очередь, в зависимости интенсивности и положения полос в спектрах поглощения и флуоресценции от природы растворителя. При этом часто изменяются фотофизические процессы в молекуле, приводящие к изменению констант скоростей излучательных и безызлучательных процессов и, как следствие, к изменению квантовых выходов фотохимических реакций.

Спектроскопические методы позволяют фиксировать особенности специфических фотоиндуцированных процессов, происходящих внутри и между молекулами и, более того, химические и структурные изменения таких объектов могут отслеживаться и управляться в интерактивном режиме с помощью люминесцентных молекулярных зондов, обладающими известными спектральными свойствами. С целью решения общей фундаментальной задачи по установлению связи фотофизических и спектрально-люминесцентных свойств органических молекул с их строением обычно проводят экспериментально и теоретически с помощью методов квартовой химии сравнительный анализ природы электронно-возбужденных состояний и фотопроцессов, происходящих в молекуле и ее родственных соединениях. Для понимания механизма формирования спектров поглощения и флуоресценции соединений рассчитывают и анализируют схемы электронно-возбужденных состояний исследуемых молекул, а также локализацию молекулярных орбиталей [2] и значения минимумов электростатического потенциала около

молекулы, тем самым изучают возможность взаимодействия молекулы с другими соединениями.

Тема: Спектрально-люминесцентные свойства сульфгина.

Цель работы: Изучение спектральных характеристик сульфгина в воде.

Задание:

1. Изучить теорию электронной спектроскопии и флуоресценции. Изучить действие антибиотика на живой организм
2. Познакомиться с принципом действия прибора *СМ2203*.
3. Растворить антибиотик в водных растворах.
4. Получить зависимости интенсивности поглощения и флуоресценции антибиотика в воде от концентрации.
5. Проанализировать результаты, составить таблицы и нарисовать диаграммы. Сделать выводы. Отчет представить в файлах в форматах Excel, Word, Origin и PowerPoint.

В результате выполнения лабораторной работы студент должен:

Знать:

- физические явления, лежащие в основе метода исследования состава, структуры и свойств вещества;
- принцип работы и конструкцию устройств и приборов, используемых в данном методе исследования;
- практические возможности методов.

Уметь:

- проводить необходимые эксперименты;
- получать результаты, их обрабатывать и анализировать в рамках используемого метода;
- дать оценку использования полученных результатов в практических целях.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Электронная спектроскопия поглощения и излучения

Поглощение и испускание электромагнитного излучения в видимой или УФ области электромагнитного спектра является одной из первых известных форм спектроскопии [1]. Они часто упоминаются в УФ/видимой спектроскопии и являются их простейшей формой, непосредственно определяемой с помощью человеческого глаза. Поглощение или испускание излучения в этом частотном диапазоне происходит благодаря переходу между различными электронными состояниями молекулы. Для большинства молекул только несколько низших электронно-возбужденных состояний являются доступными для использования радиации в этом частотном диапазоне. Эти возбуждённые состояния во многом включают высшие занятые и нижние свободные молекулярные орбитали. Природа этих орбиталей определяется из наблюдения УФ/видимого излучения и может дать детальное видение электронной структуры молекулы.

Эта информация может в свою очередь быть недоступной в понимании химических реакций. Первый принцип фотохимической активации, так называемый закон Гроттуса-Дрейпера, утверждает, что для того, чтобы возбудить фотохимическую реакцию, свет должен быть поглощен молекулой. Энергия этого света может возбудить молекулу в реактивное возбужденное состояние и это может быть использовано для инициирования фотохимической реакции. Такие реакции существенны для многих промышленных и биологических процессов, таких как фотодинамическая терапия (в которой лекарства часто упоминаются как фотосинтезированные, активируются при попадании света на

них), солнечные батареи (так же известные как фотоэлектрические батареи) которые преобразуют свет в электричество, или процесс человеческого зрения, в котором первым шагом является фотоизомеризация 11-цис ретиналя (хромофорная группа белка) изомеризуется в 11-транс-ретиналь путем поглощения света.

Возбуждение молекулы из основного состояния в возбужденное электронное состояние происходит благодаря поглощению фотона и по этой причине часто упоминается как однофотонное поглощение. В очень интенсивных областях лазера, возбужденные состояния также могут быть достигнуты с помощью одновременного поглощения двух фотонов с половиной энергии возбуждения, которое известно, как двухфотонное поглощение, у которого есть ряд своих преимуществ.

С открытием рентгеновского излучения Вильемом Рентгеном в 1895 году, оно стало также считаться высшей энергетической областью электромагнитного спектра. Поглощение рентгеновского излучения может возглавить возбуждение электрона из одной из самых внутренних орбиталей молекулы. Как эти орбитали в большинстве случаев сохраняют свой атомный характер, рентгеновская спектроскопия предоставляет информацию, которая более специфична для атомов чем УФ или видимая спектроскопия, такую как высшие заселенные и нижние незаселенные молекулярные орбитали в основном делокализованные над наибольшей частью молекулярной структуры.

Вовлечение энергии, которая возбуждает электрон в высшие электронные уровни, является (на молекулярной шкале) достаточно большой, будучи намного больше, чем энергия вовлеченная в возбужденная, колебательное или вращательное многообразие молекулы. Теперь молекул в

электронном возбужденном состоянии в конце концов хотят избавиться от избытка энергии, приобретенной в процессе поглощения и существует несколько процессов с помощью которых это может быть достигнуто. Эти процессы хорошо отображают диаграммы Яблонского, как показано на рисунке 1. В этой диаграмме иллюстрируется процесс, который может иметь место, когда один или два фотона поглощаются молекулой, переносит молекулу из основного состояния S_0 в возбужденное электронное состояние S_n . Сейчас коротко поговорим о различных процессах.

Для колебательных переходов, находящихся в Франк-Кондановском приближении, возбуждение будет в основном происходить в некоторых различных колебательных состояниях в электронном возбужденном состоянии, и возможность для возбуждения специфик особого колебательного состояния дается с помощью Франк-Кондановского фактора. В ансамбле молекул электронное возбуждение будет главным для группы молекул в числе колебательных состояний, в частности, электронных возбужденных состояний. Эти молекулы будут в основном пытаться достигнуть низшего колебательного уровня электронного возбужденного состояния, будет делать так с помощью столкновения с окружающими молекулами, преобразования и внутримолекулярные состояния могут также вызывать безызлучательные переходы в колебательные состояния различных электронных возбужденных состояний. Это называется внутренней конверсией, и является уменьшение заселенности высшего электронного возбужденного состояния, в большинстве случаев в конце концов до нижнего синглетного возбужденного состояния.

В случае, где в колебательном состоянии с различной кратностью спинов, имеют значительное перекрытие,

молекулярные столкновения могут также вызывать изменения одного электронного возбуждённого состояния в электронное возбужденное состояния с другой кратностью спина. Это называется внутренней конверсией и является важным процессом, с помощью которого может быть достигнуты возбужденные состояния с кратностью спина отличной от основного электронного состояния. Возбужденные состояния с кратность спина отличные от основного состояния могут так же быть достигнуты с помощью запрещенным по спину переходу, хотя поглощение между уровнями, имеющими различную мультиплетность, для таких процессов намного меньше, чем разрешенный электродипольный переход между состояниями с одинаковой мультиплетностью. Заметим, однако, что для веществ, содержащих тяжелые элементы, релятивистские эффекты могут вызвать значительное поглощение для уровней с различной мультиплетностью для спин-запрещенных переходов в нерелятивистской терминологии.

Молекулярные столкновения часто происходят в растворе, молекулы с оболочкой закрытого типа возбуждаются в электронное возбужденное состояние будут, через быструю внутреннюю и интеркомбинационную конверсию, релаксируют до их нижнего синглетного или триплетного возбужденного состояния. При условии достаточно долгого времени излучении для этого нижнего возбужденного состояния, эта молекулярная структура будет релаксировать в соответствующую равновесную геометрию. Этот безызлучательный процесс ведет к увеличению заселенности низшего возбужденного состояния с различными мультиплетностями, является основой для правила Коши, которое утверждает, что фотоэмиссия, будь то флуоресценция или фосфоресценция, происходит только с заметным

квантовым выходом из нижнего возбужденного состояния в данной мультиплетности.

Странно одно: почему эти безызлучательные процессы не всегда переносят молекулы вплоть до основного электронного состояния. Ничто не может объяснить, что вероятнее будет происходить внутренняя и интеркомбинационная конверсии, когда есть сильная связь между колебательными волновыми функциями в двухэлектронном состоянии. Эта связь будет в большинстве случаев наибольшей, когда маленькая энергия различна между двумя колебательными состояниями (и также электронные энергии). В то время как различия между разными электронными возбужденными состояниями в основном малы, ведущие к эффективной внутренней и интеркомбинационной конверсиям Электронное основное состояние в большинстве случаев хорошо изолировано от электронных возбужденных состояний, и таким образом не имеет значительных перекрытий с возбужденным состоянием за исключением значительного нежелательного искажения геометрии. Эффективность внутренней и интеркомбинационной конверсий зависит от большой степени от плотности электронного возбужденного состояния. Это рассмотрение также значит, что отклонения от правила Каши может произойти: если часть возбужденного состояния хорошо отделена от всех других электронных состояний, это может получить значительную заселенность несмотря на присутствие низшего возбужденного состояния этой мультиплетности. Азулен – это пример молекулы с изолированным S_2 состоянием, которое показывает значительное излучение.

Если время жизни возбужденного состояния значительно длинное, молекулы могут также поглощать дополнительные

фотоны. Следуя нашим рассуждениям о внутренней и интеркомбинационной конверсиях, такие поглощения из возбужденных состояний вероятнее произойдет и из низшего возбужденного состояния данной мультиплетности. Не существует принципиальной разницы между поглощением в возбужденном состоянии или основном. Однако, с вычислительной точки зрения, моделирования поглощения из возбужденного состояния будет в основном требовать оптимизации молекулярной структуры в возбужденном электронном состоянии. Этот принципиально при использовании данного многоуровневого метода, который явно ссылается на волновую функцию возбужденного состояния. Из двойного остатка квадратичного от функции можем получить электронные дипольные моменты переходов между различными возбужденными состояниями как ожидаемое значение свойств возбужденного состояния. Этот подход позволяет определить, как равновесное возбужденное состояние геометрии при релаксации из возбужденного состояния молекулы, так и момент перехода между различными возбужденными состояниями, даже если мы думали только оптимизировать волновую функцию или плотность основного состояния.

Молекула в электронном возбужденном состоянии будет в конце концов возвращаться в основное электронное состояние и это может случиться даже с помощью безызлучательных переходов как написано выше или с помощью излучения энергии. Из правила Каши следует, что основная часть фотоэмиссии происходит из нижнего возбужденного состояния данной мультиплетности и это излучение может быть спонтанным или вынужденным с вероятностью пропорциональной моменту перехода между основным и возбужденным состоянием. Этот процесс

излучения упоминается как фотолюминесценция, которая разделяется на флуоресценцию и фосфоресценцию. Излучение при релаксации из возбужденного синглетного состояния симметричного спина (а именно, возбужденного состояния такого же спина как электронное основное состояние) упоминается как флуоресценция. Излучение света из возбужденного триплетного состояния (а именно из состояния с мультиплетностью отличной от основного электронного состояния) упоминается как фосфоресценция и часто происходит с более долгим временем жизни для возбужденного состояния, в некоторых случаях в течении минут или часов.

Диаграмма Яблонского (рис. 1) наглядно иллюстрирует все фотофизические процессы, которые могут следовать за фотоактивацией молекулы. Она так же дает понимание того, что может быть получено из спектрального анализа.

Можно выделить три типа излучательных процессов [2]:

1. Флуоресценция происходит при излучательных переходах между состояниями одной мультиплетности и представляет собой быстрый процесс (константа скорости флуоресценции k_f —порядка 10^6 – 10^9 с⁻¹). Флуоресценция (разрешенная по спину) соответствует переходу S_1 – S_0 .

2. Фосфоресценция происходит при переходах между состояниями различной мультиплетности. Типичным процессом является переход T_1 – S_0 , реже наблюдаются переходы T_n – S_0 . Поскольку этот процесс запрещен по спину, константа скорости его гораздо меньше (k_p порядка 10^{-2} – 10^4 с⁻¹), чем для процесса флуоресценции. Излучательное время жизни – это время, за которое интенсивность уменьшается в e раз и определяется выражением: $\tau = 1/k_p$.

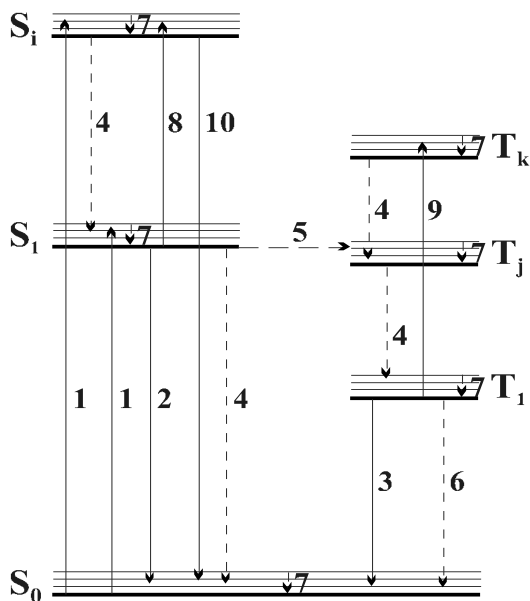


Рис. 1. Общая схема фотофизических процессов в многоатомной молекуле (где i, j и k – электронно-возбужденные состояния): (1 – $S_0 - S_i$ – поглощение; 2 – флуоресценция; 3 – фосфоресценция; 4 – $S_i - S_j$ – внутренняя конверсия (BK); 5 – $S_i - T_j$ – интеркомбинационная конверсия (ИКК); 6 – $T_1 - S_0$ – конверсия; 7 – колебательное перераспределение (релаксация); 8 – $S_0 - S_i$ – поглощение; 9 – $T_1 - T_k$ – поглощение; 10 – флуоресценция из высших электронных состояний)

3. Замедленная флуоресценция отличается от обычной тем, что её скорость затухания меньше, чем можно было бы ожидать при переходах, приводящих в этом случае к испусканию света. Замедленная флуоресценция бывает двух типов: Е типа и Р типа. Испускание замедленной флуоресценции типа Е происходит в результате термической активации молекул из нижнего триплетного состояния в первое возбужденное синглетное состояние и последующего излучательного перехода в основное

состояние. Замедленная флуоресценция Р типа или триплет-триплетная аннигиляция заключается в том, что две молекулы в триплетном состоянии взаимодействуют друг с другом, в результате чего одна из молекул переходит в нижнее синглетное возбужденное состояние, а другая в основное синглетное состояние.

2. Сульгин

При нынешнем многообразии противомикробных препаратов по-прежнему важную роль в борьбе и профилактике различного рода инфекций являются сульфаниламиды (рис 2). Сульфаниламиды – группа лекарственных препаратов, которые являются производными амидов сульфаниловой кислоты и широко используются в медицине и ветеринарии обладая антибактериальной, гипогликемической и другими видами биологической активности. Не смотря на разнообразное количество новых антибактериальных средств, сульфаниламиды регулярно назначаются для лечения различных инфекционных заболеваний.

Характерными представителями сульфаниламидов являются сульфаниломид (стрептоцид), стрептоцид растворимый, сульфацил-натрий, уросульфан, сульгин, норосульфазол (сульфатиазол), фаталазол, этазол, сульфадимезин, сульфапиридазин, сульфамонетоксин, сульфадиметоксин, сульфален, саладозин.

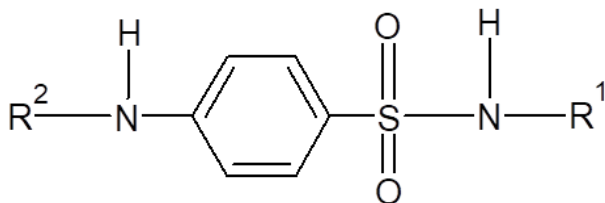


Рис. 2. Общая формула сульфаниламидов

Сульфаниламиды стали первыми лекарственными средствами, позволившими проводить успешную профилактику и лечение бактериальных инфекций. Благодаря этим препаратам в медицинской практике с 1930 годов удалось значительно снизить смертность от воспаления легких, заражения крови и других бактериальных инфекций. Открытие антибиотика носило случайный характер – химик Гельмо (1908-1909) синтезировал *n*-аминобензол-сульфамид (или белый стрептоцид), который получил сначала широкое распространение в красильной промышленности.

Одним из ярких представителей сульфаниламидов является сульфагуанидин или сульгин (рис. 3). Представляющий собой белый мелкокристаллический порошок, который мало растворим в воде, спирте и ацетоне. Сульгин относится к антибактериальным препаратам, является эффективным средством для лечения кишечных инфекций. Назначается при острой, подострой и хронических бактериальных дизентериях, колитах, энтероколитах, при брюшном тифе. [3].

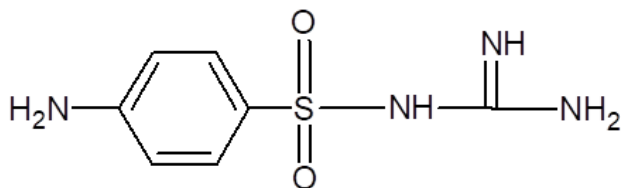


Рис. 3. Структурная формула сульгина

Широкое применение антибиотиков привело к проблемам: 1) остатки антибиотиков (сульфаниламиды и тетрациклины) определяются у морского леща (*Sparus Aurata*) и в образцах корма; 2) антибиотики легко всасываются из желудочно-кишечного тракта и быстро накапливаются в крови, органах и тканях в бактериостатических концентрациях в живых организмах; 3) наибольшее количество их обнаруживают в почках, легких, стенках желудка и кишечника, сердце, печени. Сульфаниламиды хорошо проникают через плаценту у беременных женщин [4].

Механизм действия сульгина заключается в следующем: *p*-аминобензойная кислота (ПАБК) близка по структуре с сульфаниламидами. ПАБК необходима микроорганизмам для синтеза дигидрофолиевой кислоты. В тканях человека этого не происходит, так как ткани человека используют уже готовую дигидрофолиевую кислоту. Этим и объясняется избирательность противомикробного действия сульфаниламидов. ПАБК является фактором роста микроорганизмов, которые из ПАБК синтезируют фолиевую и дигидрофолиевую кислоты. Нарушение синтеза дигидрофолиевой кислоты уменьшает образование из нее тетрагидрофолиевой кислоты, которая необходима для синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований. В результате этого угнетается синтез нуклеиновых кислот,

вследствие чего рост и размножение микроорганизмов подавляются и человек выздоравливает.

РАБОЧАЯ УСТАНОВКА

Спектроскопическими методами анализа называются методы, основанные на взаимодействии вещества (в данном случае – анализируемого образца) с электромагнитным излучением. На спектральных приборах ученые получают спектры исследуемого вещества. Спектр является индивидуальной характеристикой вещества. Положение линий в спектре является основой качественного анализа, по интенсивности линий можно проводить количественный анализ содержания вещества с той или иной степенью точности.

Спектрофотометр и его применение

Цвет является ощущением, что возникает в человеческом мозге из-за цветового стимула (лучистая энергия, которая проникает в человеческий орган зрения). Но бывают ситуации, когда цвет необходимо измерить. Для этого ученые и инженеры создали прибор – спектрофотометр.

Спектрофотометр – прибор, предназначенный для измерения отношений двух потоков оптического излучения, один из которых – поток, падающий на исследуемый образец, другой – поток, испытавший то или иное взаимодействие с образцом. Прибор позволяет производить измерения для различных длин волн оптического излучения, соответственно в результате измерений получается спектр отношений потоков. Спектрофотометр обычно используется для измерения спектров пропускания (поглощения) или спектров отражения излучения.

В качестве исследуемого образца для измерения может быть – жидкость, твердое тело, паста, гранулы, пленки или порошки.

Спектрофотометры могут работать в различных диапазонах длин волн – от ультрафиолетового до инфракрасного. В зависимости от этого приборы имеют разное назначение.

Спектрофотометры по назначению подразделяются на следующие категории:

➤ Если нужны точный анализ цвета, испытания и аттестация сырьевых материалов, то применяют стационарные приборы (для исследований, измерения степени пропускания прозрачных предметов и белизны предмета с ультрафиолетовыми компонентами).

➤ Спектрофотометры портативной конфигурации дают возможность измерить цвет в режиме реального времени и на любом этапе производственного процесса. Такие приборы легкие и очень удобные, их можно транспортировать. В настоящее время существуют современные портативные компактные и легкие спектрофотометры, предназначенные для измерения, контроля и сравнения цвета пластмасс, ткани, кожи, окрашенных поверхностей и других материалов в автомобильной, текстильной, радиоэлектронной, фармацевтической, косметической, пищевой промышленности и т.п.

Основное назначение спектрофотометров в полиграфической отрасли – проведение точной линейаризации и калибровки процессов печати. Спектрофотометры предоставляют возможность проведения точечных и автоматизированных измерений для создания высококачественных ИСС-профилей.

Использование в качестве источника излучения ксеноновой лампы позволило разработчикам размещать прибор в различных плоскостях поверхности образца. Эргономичный корпус и видоискатель с подсветкой обеспечивают точное и быстрое позиционирование при измерении конкретного цвета.

Основные характеристики прибора

На рисунке 4 приведены основные элементы в схеме спектрофотометра: источник света, монохроматор, исследуемый образец и детектор.

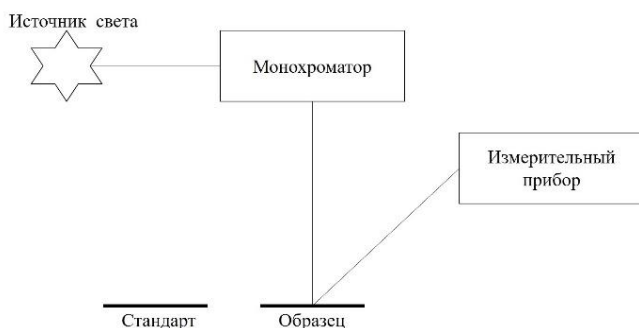


Рис. 4. Упрощенная схема спектрофотометра

Исследуемый образец пропускает либо отражает падающий на него свет от источника освещения.

Измерение спектрофотометром происходит следующим образом: лампа (источник излучения) излучает измерительный свет, он попадает на монохроматор (призму либо дифракционную решетку), который разделяет его на части, каждая часть по-разному пропускается или отражается от исследуемого образца. Свет, проходя через вещество,

попадает на фоточувствительный элемент, который выдает данные об энергетическом распределении по отраженному, поглощенному либо пропущенному образцом излучаемому от лампы спектру. Как итог получается коэффициент отражения либо пропускания, он выражается в процентах – это то (спектр), что мы с вами регистрируем и видим на экране монитора.

Чтобы подробнее познакомиться с характеристиками спектрофотометра, на котором нам предстоит работать, необходимо прочитать следующий параграф.

Вид и основные характеристики спектрофотофлуориметра СМ 2203

Вид и основные характеристики спектрофотофлуориметра **СМ 2203** показаны на рисунке 5.

Оптическая схема спектрофлуориметра в режиме спектрофотометра состоит из осветителя **I**, монохроматора **II** и кюветного отделения **III**.

Осветитель **I** включает в себя источник излучения **1** (ксеноновая короткодуговая лампа типа ДксШ 150-3, имеющая почти непрерывный спектр излучения в области 220÷4000 нм), контротражатель **2** и эллипсоидное фокусирующее зеркало **3**.

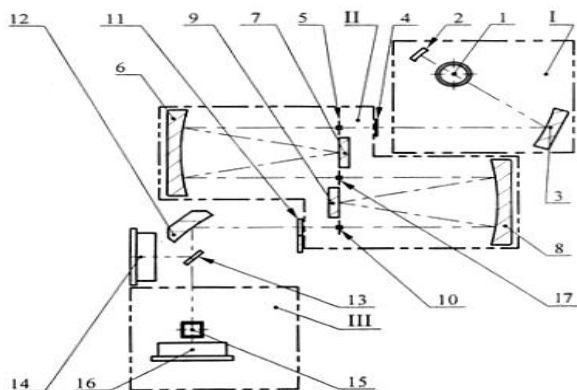
Между осветителем **I** и монохроматором **II** установлен блок сменных диафрагм **4**, служащий для дискретного изменения светового потока, падающего на входную щель **5** монохроматора возбуждения, с целью расширения динамического диапазона работы прибора. Монохроматор возбуждения люминесценции **II** - двойной, служит для селекции длин волн возбуждающего излучения с низким уровнем рассеянного излучения.

Содержит входную щель **5**, два коллиматорных объектива **6** и **8**, промежуточную щель **29**, выходную щель **10**, две идентичные дифракционные решетки **7** и **9**. Диапазон раскрытия входной и выходной щелей монохроматора от 0 до 4 мм (ширина щелей), высота щелей - 3 мм.

Узел светофильтра **11** служит для устранения излучения высших порядков дифракции. Кюветное отделение III служит для размещения исследуемого образца. С помощью плоскопараллельной пластинки **13** на фотодиод **14** (типа ФДУК-2) отводится часть излучения с целью контроля нестабильности источника (опорный канал). Излучение, прошедшее кювету **15** с исследуемым образцом, регистрируется фотоприемником **16** измерительного канала. В качестве фотоприемного устройства используется кремниевый фотодиод типа ФДУК-2. Промежуточная щель обозначена цифрой **17**.

Спектрофотофлуориметр СМ 2203 является полностью управляемым от компьютера. Он может применяться как в ультрафиолетовой, так и видимой области спектра. СМ 2203 обеспечивает высокочувствительные и стабильные измерения спектров возбуждения, испускания, синхронных, поляризации, температурных, квантового выхода, поглощения жидких и твёрдых образцов.

Высокая чувствительность, надёжность, широкая спектральная область работы и универсальный набор измерительных и программных функций обеспечивают применение СМ 2203 в различных областях: медицине, биохимии, фармакологии, пищевой промышленности, экологии, химии, криминалистике.



1 – осветитель (лампа ДксШ-150-1М); III – кюветное отделение;
 II – монохроматор; 16 – фотоприемник

Рис. 5. Внешний вид спектрофотофлуориметра SM 2203 и оптическая схема в режиме спектрофотометра

Программные функции прибора SM 2203:

- коррекция спектров возбуждения и испускания;
- дифференцирование, интегрирование, сглаживание, интерполяция
- представление спектров в шкале длин волн или волновых чисел;
- арифметические действия между спектрами;

- автоматический поиск максимумов и минимумов в спектре;
- автоматический и ручной выбор масштаба изображения;
- вывод на принтер спектров, кинетических кривых, таблиц;
- создание и хранение методик с последующим выполнением по ним конкретных заданий;
- сохранение условий и результатов измерений.

Технические характеристики:

- чувствительность отношение сигнал/шум - не менее 160 для Рамановского спектра воды (при выделяемой спектральной полосе пропускания монохроматоров 5 нм и времени усреднения сигнала 2 сек.);
- монохроматор двойные со сложением дисперсии;
- выделяемый спектральный интервал произвольный: 0...15 нм;
- точность установки длины волны $\pm 0,5$ нм;
- спектральный диапазон 200...820 нм;
- кюветное отделение однопозиционный термоэлектрически термостатируемый в диапазоне температур 10...60°C кюветодержатель с управляемой магнитной мешалкой;
- минимальный объем образца 1 мл в стандартной 10 мм кювете.

Режим спектрофотометра:

- спектральный диапазон 200...800 нм;
- фотометрический диапазон - 0,3...3 Б;
- точность фотометрирования < 3% (в зависимости от величины поглощения);
- интерфейс RS232;

- энергопотребление 220 (± 10 %) В, 50Гц, 350 ВА;
-вспомогательное оборудование устройство для поляризационных измерений, держатель твёрдых образцов, оптоволоконный зонд для измерения люминесценции вне кюветного отделения, "стандартный" люминесцирующий образец с широкодиапазонным спектром люминесценции.

Техника безопасности при выполнении работы

Опасность представляют использование электроприборов. Перед началом работы необходимо убедиться в исправности приборов и наличии защитного заземления.

Оценка необходимой степени точности

Данные физических или химических измерений неизбежно включают некоторые ошибки или погрешности. Результатом отдельного экспериментального наблюдения является *измеряемое* значение X . Разность между X и *истинным* значением X_0 данной величины представляет собой ошибку конкретного измерения. На практике, однако, невозможно выполнить бесконечно большое число измерений. Точность результата чаще всего выражают с помощью *стандартного отклонения* s , которое представляет собой квадратный корень из второго момента распределения относительно среднего значения и является мерой точности результатов измерения.

Стандартное отклонение вычисляется по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{N-1}},$$

где X_i – конкретное измеряемое значение; \bar{X} – среднее арифметическое значение; N – число измерений.

Источники ошибок

1. Неверный выбор режима работы прибора.
2. Случайные ошибки при подготовке образца.
3. Изменение температуры и влажности помещения в процессе эксперимента.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Порядок выполнения работы

1. Изучить руководство по эксплуатации прибора.
2. Взять навеску вещества для матричного раствора с концентрацией 10^{-3} моль \times л $^{-1}$. Растворитель – дистиллированная вода.
3. Из матричного раствора получить растворы с концентрациями 10^{-4} ; $7,5\times 10^{-5}$; 5×10^{-5} ; $2,5\times 10^{-5}$; 10^{-5} ; $7,5\times 10^{-6}$; 5×10^{-6} ; $2,5\times 10^{-6}$; 10^{-7} .
4. Водные растворы записать на спектрофотометре СМ2203 в режиме поглощения относительно воды.
5. Перевести данные спектров в табличные значения и построить спектры поглощения исследуемых образцов в программном пакете Origin.
6. Построить график зависимости интенсивности поглощения от концентрации, проверить выполнение закона Бугера-Ламберта-Берра для данных растворов.
7. Записать спектры флуоресценции для этих растворов. Построить спектры в графическом редакторе. Записать спектры возбуждения флуоресценции на длине волны эмиссии – максимум полосы флуоресценции сульгина.
8. Данные исследования занести в таблицу и представить в виде рисунков, оформить результаты лабораторной работы в любом из форматов: doc, rtf, docx.
9. Построить график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации.
10. Построить диаграмму Яблонского для сульгина. Проанализировать данные.
11. Оценить ошибки измерения. Сделать практические рекомендации.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое поглощение?
2. Что такое пропускание?
3. Что такое длина волны света?
4. В чем заключается механизм поглощения света веществом?
5. Сульгин: к какому классу препаратов относится, для чего используется, какую опасность несет остаточное количество сульгина в организме человека и животного?

ЛИТЕРАТУРА

1. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. – М.: Техносфера, 2007. – 368 с.
2. Майер Г.В. Фотофизические процессы и генерационная способность ароматических молекул, Томск: ТГУ. – 1992. – 265 с
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей / М.Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – С. 833.
4. Cháfer-Pericás C., Maquieira Á., Puchades R., Miralles J., Moreno A. / Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS // Food Control. – 2011. – V. 22. – №6. – P. 993-999.

Учебное издание

ЧАЙКОВСКАЯ Ольга Николаевна, ЧАЙДОНОВА Влада Сергеевна

**СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА
АНТИБИОТИКОВ**

Лабораторная работа

Подписано к печати 08.12.2021 г. Формат 60×84¹/₁₆.

Бумага для офисной техники. Гарнитура Times.

Печ. л. 1,8. Тираж 30 экз. Заказ № 4881.

Отпечатано на оборудовании
Издательства Томского государственного университета
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36
Тел. 8+(382-2)–52-98-49
Сайт: <http://publish.tsu.ru>
E-mail: rio.tsu@mail.ru